

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE BIFLAVONÓIDES ISOLADOS DE *OURATEA SPECTABILIS* (OCHNACEAE) EM CÉLULAS DE CórNEA DE COELHO SIRC

I.C. Simoni, J.D. Felicio, E. Gonzalez, M.H. Rossi

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

A citotoxicidade dos biflavonóides 6,6"- bigenkwanin (OSP-1), 7,7"- dimetoxi-agathisflavona (OSP-2) e tetradimethoxiflavona (OSP-1 Met) isolados de folhas de *Ouratea spectabilis* foram avaliadas em linhagem celular de córnea de coelho, SIRC pela determinação da medida espectofotométrica nas concentrações das substâncias que inibem a absorbância em 50% do controle. OSP-1, OSP-2 e OSP-1 Met apresentaram IC₅₀ nas concentrações de 381,9 ± 22,29; 436,74 ± 22,05 e 359,7 ± 24,25 µg/mL, respectivamente. Estes compostos apresentam atividade inibidora para a aldose redutase, enzima relacionada com o início da formação da catarata em diabéticos.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade, linhagem celular, biflavonóides, aldose redutase.

ABSTRACT

CYTOTOXICITY OF BIFLAVONOIDS ISOLATED FROM *OURATEA SPECTABILIS* (OCHNACEAE) IN SIRC CELL LINE. The cytotoxicity of 6,6"- bigenkwanin (OSP-1), 7,7"- dimethoxy-agathisflavone (OSP-2) and tetradimethoxyflavone (OSP-1 Met) isolated from leaves of *Ouratea spectabilis*, was evaluated in SIRC cell line by spectrophotometric measurement, the concentrations of substances that inhibited the absorbance to 50% of the control level (IC_{50%}). The OSP-1, OSP-2 and OSP-1 Met presented IC_{50%} of 381.9 ± 22.29; 426.74 ± 22.05 and 359.7 ± 24.25 µg/mL respectively. These compounds present inhibitory activity for aldose reductase, the enzyme that initiates cataract formation in diabetes.

KEY WORDS: Citotoxicity, cell line, biflavanones, aldose reductase inhibitor.

A família Ochnaceae é pouco conhecida do ponto de vista químico e biológico, sendo os gêneros *Ochna* e *Lophira* os mais conhecidos. Investigações sobre a composição química de espécies do gênero *Ouratea*, levaram ao isolamento de vários biflavonóides (FELICIO *et al.*, 1995 e 2001; MOREIRA *et al.*, 1994 e 1999; VELANDIA *et al.*, 1998).

Os biflavonóides (Fig. 1) 6,6"- bigenkawanin (OSP-1), 7,7"- dimetoxi-agathisflavona (OSP-2) isolados das folhas de *Ouratea spectabilis*, e tetradimethoxiflavona (OSP-1 Met), obtido por metilação do biflavonóide OSP-1 demonstraram atividade inibidora da aldose redutase (FELICIO *et al.*, 1995), que é uma enzima de poliol, a qual está envolvida na redução da glicose a sorbitol na presença de NADPH. O aumento da atividade desta enzima está relacionado com patologias de muitas complicações dos diabetes, tais como catarata, retinopatia e neuropatia.

Os três biflavonóides apresentaram atividade inibidora, sendo que o composto OSP-1 foi 3 vezes mais ativo que o flavonóide quercetina, utilizado como controle positivo (FELICIO *et al.*, 1995).

Biflavonóides também apresentaram atividade inibidora (80-98%) da produção de aflatoxina B1 e B2 em cultura de *Aspergillus flavus*. (GONÇALEZ *et al.*, 2001). As aflatoxinas são substâncias toxigênicas, carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas para diferentes espécies animais (FAN & CHEN, 1999).

Flavonóides e biflavanos oriundos de várias espécies de plantas apresentam diversas atividades, tais como, analgésica, antiinflamatória, antidiabéticas e inibidora da atividade aldose redutase (VARMA, *et al.*, 1975; BARBERÁN, *et al.*, 1986; IINUMA, *et al.*, 1989; MAURICE, *et al.*, 1990), justificando assim, a avaliação da sua possível toxicidade previamente à sua aplicação terapêutica para o controle da catarata ou em outras prescrições. O uso de culturas celulares mostra-se como um dos métodos de fornecimento rápido deste tipo de informação, além disso, complementam os testes *in vivo*, e por serem mais econômicos, reproduzíveis e de fácil manutenção, evitam os problemas éticos relacionados ao uso de testes em animais (SEGNER *et al.*, 1994; HUSSON *et al.*, 1995).

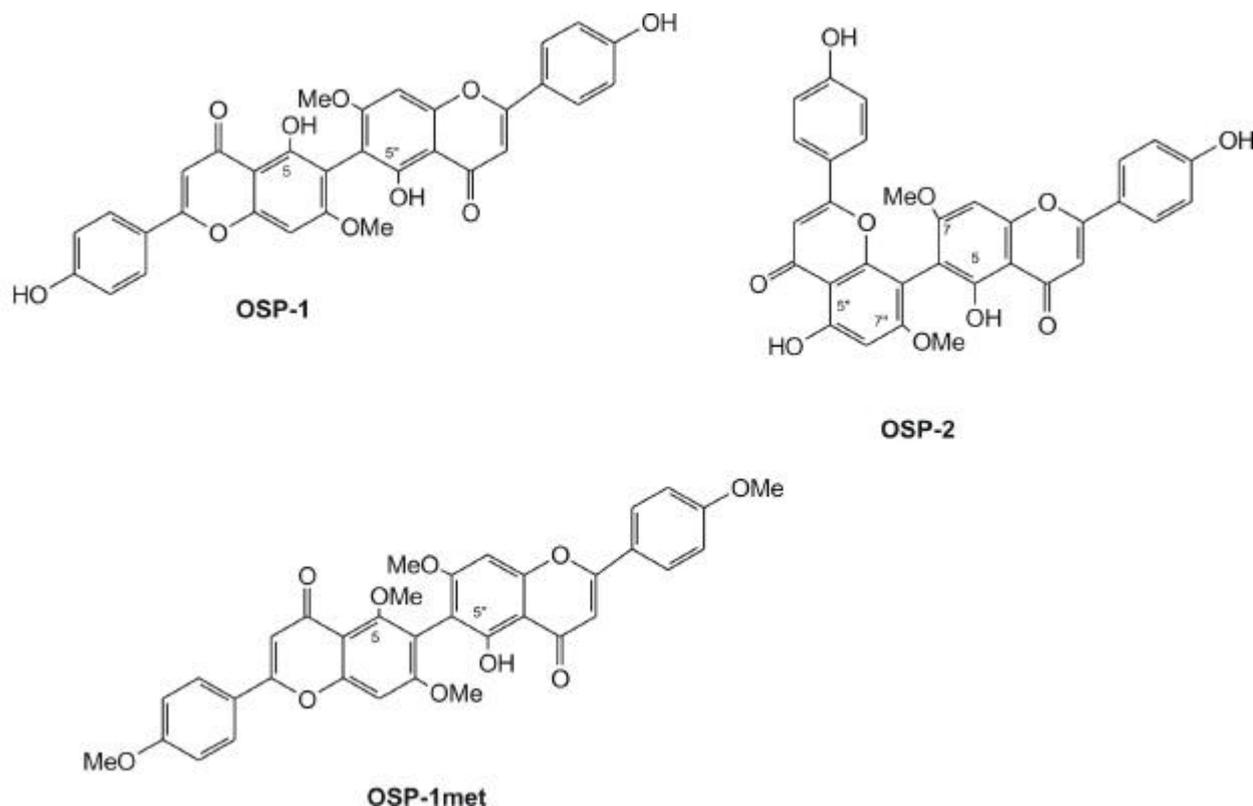


Fig. 1 - Estrutura dos biflavonóides isolados de *Oureatea spectabilis*, avaliados em célula de córnea de coelho, SIRC.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade dos biflavonóides pelo método de coloração com violeta cristal utilizando-se a linhagem contínua SIRC.

A utilização das células SIRC pode substituir os testes *in vivo* feitos em córneas de coelhos (ITAGAKI, *et al.*, 1991) e estas células são muito utilizadas em testes de citotoxicidade (TANI *et al.*, 1999).

A linhagem celular SIRC de córnea de coelho - ATCC-CCL 60 - (*Oryctogalus cuniculus*) foi adquirida na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz e contava com 500 subcultivos. Em nosso laboratório foi mantida em Meio Eagle Mínimo (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Os biflavonóides foram isolados e identificados como relatado anteriormente por FELICIO *et al.* (1995).

Soluções estoques a 2.000µg/mL dos biflavonóides foram preparadas da seguinte maneira: primeiro, dissolveu-se em 0,5 a 1 mL de etanol, depois se adicionou partes iguais de água e MEM duas vezes concentrado, para obter uma concentração final de 2.000 µg/mL. Em seguida, esterilizou-se através de membrana filtrante da marca Millipore 0,22µm, distribuiu-se em alíquotas que foram estocadas à -20° C. Além disso, uma solução controle contendo 1 mL de etanol (5% de etanol na solução final), foi preparada, como descrito acima, porém sem a adição dos compostos, com a finalidade de avaliar a citotoxicidade do solvente sobre as células SIRC.

Empregou-se o método de coloração por violeta cristal descrito por ITAGAKI, *et al.* (1991) para a avaliação da citotoxicidade em células SIRC. Em microplaca de 96 orifícios, adicionou-se 0,1 mL de MEM com 10% de SFB em todos os orifícios e 0,1 mL de biflavonóide a 2.000µg/mL apenas na fileira 1. Em seguida fez-se diluição seriada de biflavonóide até a coluna 6, obtendo-se concentração do biflavonóide de 1.000 a 31,25µg/mL. Depois, adicionou-se 0,1 mL de suspensão celular ($5,0 \times 10^4$ células/orifício) nas fileiras de 1 a 8 e a diluição destas células foi feita da fileira 8 até a 11, obtendo-se concentração das células de 50.000 a 3.125, para obtenção da curva padrão. Após 72 horas de incubação, o meio nutritivo MEM foi descartado e as células fixadas e coradas com solução de violeta cristal a 0,4% em metanol por 30 minutos. A análise quantitativa foi feita pela avaliação colorimétrica das células fixadas através da medida da absorbância em leitor de placa (BIO-RAD, modelo 3550 UV) a 595 nm. A concentração do biflavonóide que inibiu o crescimento celular em 50% da absorbância do controle ($IC_{50\%}$) foi obtida através de uma curva dose - resposta. Os ensaios foram repetidos três vezes e foram feitas 8 repetições para cada concentração de biflavonóide em cada ensaio ($n = 24$). A significância dos resultados foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste t student assumindo que $p < 0,05$.

As curvas concentração-resposta foram obtidas para os biflavonóides OSP-1, OSP-2 e OSP-1-Met como mostra a Fig. 2. Pode-se observar que apenas nas concentrações acima de 500 µg/mL o biflavonóide OSP-1 Met inibiu totalmente o crescimento das células SIRC após 72 horas e acima de 1.000 µg/mL para os outros OSP-1 e OSP-2. O crescimento das células SIRC em presença do solvente (etanol) não foi afetado como se observa na Figura 2 onde a absorbância obtida foi sempre de 100% em relação à absorbância das células que cresceram em meio na ausência de solvente, estes resultados quando comparado aos tratados foram estatisticamente significantes.

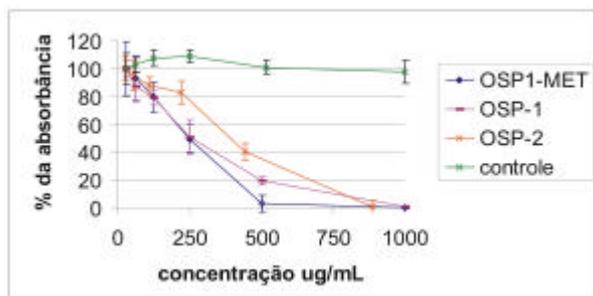


Fig. 2 - Avaliação da citotoxicidade dos biflavonóides obtidos de folhas de *Ouratea spectabilis* em células SIRC pela medida da porcentagem da absorbância em relação às células do controle coradas com violeta cristal; média e desvio padrão da % da absorbância (n = 24).

Mudanças estruturais na molécula de um biflavonóide, como presença ou ausência de um grupo metoxila, ou diferença na posição da ligação entre os dois resíduos flavonoídicos podem resultar em modificação da atividade da aldose redutase (VARMA *et al.*, 1975; IINUMA, *et al.*, 1989; FELICIO *et al.*, 1995) e também na citotoxicidade em células SIRC. Os biflavonóides, OSP-2 OSP-1 e OSP-1-Met apresentaram, respectivamente os IC₅₀ de 436,74 ± 22,05; 381,90 ± 22,29 e 359,72 ± 24,25 µg/mL.

Estes resultados indicam que as concentrações que causam inibição no crescimento das células SIRC em 50% são muito maiores do que as concentrações necessárias para inibir a atividade da aldose redutase (4,95 µg/mL para OSP1 e 11,52 µg/mL para OSP2) como descritos por FELICIO *et al.*, 1995 e portanto estes biflavonóides são promissores, sendo que outros estudos podem ser conduzidos visando sua utilização terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBERÁN, F.A.T.; GOMEZ, C.L.; VILAR, A.; LORENTE, F.T. Inhibition of lens aldose reductase by *Labiatae* flavonoids. *Planta Med.*, v.71, p.239-240, 1986.
 FAN, J.J. & CHEN J.H. Inhibition of aflatoxin-producing fungi by Welsh onion extracts. *J. Food Prot.*, v 62, p.414-417, 1999.

FELICIO, J.D.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M.M.; CONSTANTINO L.; ALBASINI A.; LINS, A.P. Inhibition of lens Aldose Reductase by Biflavones from *Ouratea spectabilis*. *Planta Med.*, v.61, p.217-220, 1995.
 FELICIO, J.D.; ROSSI, M.H.; PARK, H.R.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M.M.; DAVID, J.M.; CORDEIRO, I. Biflavonoids from *Ouratea multiflora* *Fitoterapia*, v.72, p.453-455, 2001.
 GONÇALEZ, E.; FELICIO, J.D.; PINTO, M.M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.34, p.1453-1456, 2001.
 HUSSON, G.P.; VILAGINES, P.; SARRETTE, B.; VILAGINES, R. Use of cell culture for the research of cytotoxic and antiviral effects of a natural extract of Amaryllidaceae. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.*, v.189, n.4, p.679-692, 1995.
 IINUMA, M.; TANAKA, T.; MIZUNO, M.; KATSUZAKI, T.; OGAWA, H. Structure-activity correlation of flavonoids for inhibition of bovine lens aldose reductase. *Chem. Pharm. Bull.*, v.37, n.7, p.1813-1815, 1989.
 ITAGAKI, H.; HAGINO, S.; KATO, S.; KOBAYASHI, T.; UMEDA, M. Na *in vitro* alternative to the draize eye-irritation test: evaluation of cristal Violet staining method. *Toxicol. In vitro*, v.5, n.2, p.139-143, 1991.
 IWU, M.M.; IGBOKO, O.A.; OKUNJI, C.O.; TEMPESTA, M.S. Antidiabetic and aldose reductase activities of biflavones of *Garcinia kola*. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.42, p.290-292, 1990.
 MOREIRA, I.C.; CARVALHO, M.G. DE; BASTOS, A.B.F.O.; BRAZ-FILHO, R.A. flavone dimer from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, v.51, p.833-838, 1999.
 MOREIRA, I.C.; SOBRINHO, D.C.; CARVALHO, M.G. DE; BRAZ-FILHO, R. Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*. *Phytochemistry*, v.35, p.1567-1572, 1994.
 SEGNER, H.; LENZ, D.; HANKE, W.; SHÜRMANN, G. Cytotoxicity of metals toward rainbow trout R1 cell line. *Environ. Toxicol. and Water Quality na Internat. J.*, v.9, p.273-279, 1994.
 TANIL, N.; KINOSHITA, S.; OKAMOTO, Y.; KOTANI, M.; ITAGAKI, H.; MURAKAMI, N.; SUGIURA, S.; USAMI, M.; KATO, K.; KOJIMA, H.; OHNO, T.; SAJIO, K.; KATO, M.; HAYASHI, M.; OHNO, Y. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (8) Evaluation of cytotoxicity tests on SIRC cells. *Toxicology in Vitro*, v.13, p175-187, 1999.
 VARMA, S.D.; MIKUNI, I.; KINOSHITA, J.H. Flavonoides as inhibitors of lens aldose reductase. *Science*, v.188, p.1215-1216, 1975.
 VELANDIA, J.M.; CARVALHO, M.G. DE; BRAZ-FILHO, R. Ácido ent-16 α , 17-diidroxicauran-19-óico isolado de *ouratea semiserrata* e os desafios estereoquímicos dos carbonos quirais C-4 e C-16. *Química Nova*, v.21, p.397-404, 1998.

Recebido em 4/3/02
 Aceito em 16/11/02